

# Auf dem Weg zur Populationsgenomik Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

**Spuren in den Genomen Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) geben Auskunft über Verläufe von Infektions-Ausbrüchen und Epidemien. So ermöglichte die Analyse genomweit verteilter SNPs in einer globalen Stichprobe von *S. aureus*-Isolaten Einblicke in die Häufigkeit des Resistenz-Erwerbs und die geographische Ausbreitung von MRSA. Sequenziersysteme der neuen Generation ermöglichen populationsgenetische Analysen mit erheblich verbessertem Auflösungsvermögen, und somit eine Fokussierung auf die lokale und regionale Epidemiologie der MRSA-Infektionen.**

Ulrich Nübel, Birgit Strommenger, Philippe Roumagnac, Mark Achtman, Wolfgang Witte

Das Bakterium *Staphylococcus aureus* (Abb. 1 und 2) kann eine Vielfalt von Infektionen verursachen, die von lokalen Infekten der Haut bis zu systemischen Infektionen mit schwerem Verlauf, wie beispielsweise der Sepsis, reichen. Gleichzeitig wird *S. aureus* als natürlicher Besiedler der Nasenschleimhaut bei etwa 30% aller gesunden Menschen gefunden. Angesichts dieser weiten Verbreitung sind Infektionen mit *S. aureus* selten; sie bedürfen bestimmter Dispositionen von Seiten betroffener Patienten, wie einer verminderten Funktion des Immunsystems (zum Beispiel bei Diabetes oder bei Immunsuppression in der Onkologie), Verletzungen der Haut (Unfälle, Injektionen, Inzisionen bei ärztlicher Behandlung) oder aber dem Einsatz von Plastikmaterialien und Gelenkersatz in der Medizin. *S. aureus* ist damit einer der häufigsten Erreger von Krankenhausinfektionen.

Bestimmte klonale Linien von *S. aureus*, die durch die Multilocus-Sequenztypisierung unterschieden werden, haben infolge des therapeutischen Selektionsdrucks Mehrfach-Resistenzen gegen Antibiotika entwickelt, die die Behandlungsoptionen deutlich einschränken. Die Folge ist eine erhöhte Letalität bei schweren Infektionsverläufen. Von besonderer Bedeutung ist dabei die 'Methicillin-Resistenz', die eine Unempfindlichkeit gegen alle die für die Behandlung von Staphylokokken-Infektionen so wichtigen Beta-Laktam-Antibiotika (Penicilline und andere) einschließt. Die Methicillin-Resistenz wird durch ein Enzym (PBP2a) verursacht, das eine Schlüsselrolle beim Zellwandaufbau (Transpeptidase) und damit beim Wachstum der Staphylokokken übernimmt. Weil PBP2a – anders als Penicillin-Bindeproteine in Penicillin-empfindlichen Staphylokokken – eine geringe Affinität für Beta-Lactame aufweist und seine Funktion daher durch diese Substanzen nicht blockiert werden kann, bleiben diese Antibiotika wirkungslos. Das Gen für PBP2a ist Bestandteil eines mobilen genetischen Elements, das 'SCCmec' genannt wird. SCCmec kann durch einen unbekanntem Mechanismus zwischen Staphylokokken übertragen und in das Chromosom integriert werden. Man kennt heute mindestens sechs verschiedene Typen von SCCmec, die unabhängig voneinander zur Entstehung Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) geführt haben.

Das Verfolgen des Auftretens und der Verbreitung von MRSA durch molekulare Typisierung ist eine wesentliche Voraussetzung für gezielte Präventionsmaßnahmen. Mit herkömmlichen Typisierverfahren (Makrorestriktionsmuster, Multilocus-Sequenztypisierung) werden weltweit identische Genotypen von MRSA gefunden. Folglich nahm man zunächst an, Methicillin-resistente *S. aureus* seien seit der Einführung des Methicillins nur einige Male entstanden und Krankenhaus-assoziierte Stämme von MRSA hätten sich im Folgenden global ausgebreitet. Durch unsere detaillierten Untersuchungen an Isolaten des weltweit aufgetretenen MRSA-Typs 'ST5' wird diese Auffassung jedoch in Frage gestellt.

## SNPs als epidemiologische Spuren in den Genomen der MRSA.

In Zusammenarbeit mit neun internationalen Partnern haben wir 135 Isolate des MRSA-Typs ST5 aus 22 Ländern verglichen. Dazu durchsuchten wir die Staphylokokken-Genome nach Einzelnucleotid-Polymorphismen (englisch: Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Mit Hilfe eines spezialisierten Hochdruckchromatographie-Verfahrens (denaturierende Hochdruckchromatographie, dHPLC) konnten wir über einhundert DNA-Fragmente aus allen Bakterien-Isolaten vergleichen. Die dHPLC ermöglichte das Erkennen sequenzverschiedener DNA-Fragmente, so dass nachfolgend nur diese sequenziert werden mussten, um die SNPs genauer zu charakterisieren. Auf diese Weise wurden 46.000 Basenpaare aus jedem Bakterien-Isolat untersucht (insgesamt 6,2 Mio. Basenpaare). Die Analyse der dabei entdeckten, genomweit verteilten SNPs erlaubte sehr präzise Rückschlüsse auf die Entwicklungsgeschichte der MRSA.

So konnten wir erkennen, dass aus einem *S.-aureus*-Vorläufer im Laufe der Evolution eine Reihe unabhängiger Entwicklungslinien hervorgegangen ist, von denen jede für sich mehrfach MRSA hervorgebracht hat. Es stellte sich heraus, dass die geographische Verbreitung der meisten dieser MRSA-Klone sehr begrenzt ist, so dass viele der Genotypen spezifisch nur in einzelnen Ländern oder geographischen Regionen gefunden wurden. Beispielsweise

## Arbeitsmaterial

## Modul 4 Mikrobielle Systeme

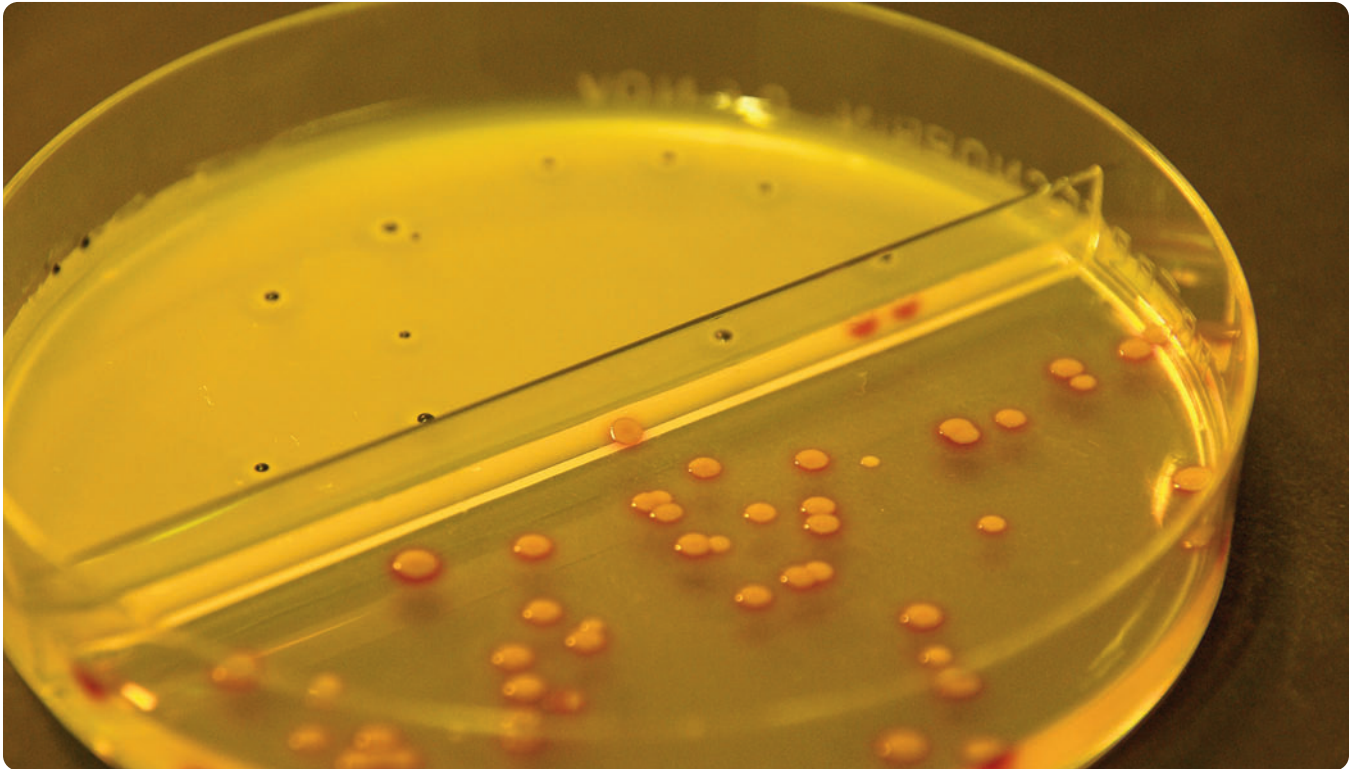


Abb. 1: Kultureller Nachweis von MRSA mittels spezieller Nährmedien (Agar). Obere Hälfte der Agarplatte: Im Gegensatz zu anderen Staphylokokkenarten wächst *Staphylococcus aureus* auf diesem Differenzierungsagar in Form von schwarzen Kolonien, die von einem hellen, durchscheinenden Hof umgeben sind. Untere Hälfte der Agarplatte: Nur MRSA-Stämme wachsen auf diesem Selektivagar als rosa bis hellviolette Kolonien.

stammten alle Abkömmlinge der Linie 'ST5-L' aus Deutschland, mit Ausnahme jeweils eines Isolats aus Österreich und den Niederlanden. Diese Isolate waren zuvor über einen Zeitraum von sieben Jahren in 15 verschiedenen, klinischen Labors gesammelt worden. Ähnlich wurden landesspezifische Genotypen auch in Japan, Taiwan, Hongkong, Polen, Israel und Südafrika gefunden. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass MRSA bis heute wahrscheinlich bereits viele hundert Male entstanden sind, wobei sich die Nachkommenschaft der meisten resistenten Klone nicht weit vom Entstehungsort entfernt haben dürfte.

### Regional geprägte Populationsstruktur

Die regional geprägte Populationsstruktur von MRSA ST5 spiegelt vermutlich die Lebensweise von *S. aureus* als verbreiteter (endemischer), kommensaler Besiedler wider. Offenbar erfolgt die Aufnahme der SCCmec-Elemente durch *S. aureus* wesentlich häufiger als zuvor vermutet. Die treibende Kraft dafür ist ein starker Selektionsdruck auf die Bakterien, der – besonders in Krankenhäusern – durch den häufigen Antibiotika-Einsatz entsteht. Als Reservoir für SCCmec können andere MRSA oder auch andere Staphylokokken-Arten dienen, beispielsweise *Staphylococcus epidermidis*. Diese verwandten Staphylokokken sind weniger pathogen als *S. aureus* und treten daher als Krankheitserreger weniger stark in Erscheinung, sie sind aber als Hautkeime weit verbreitet und sehr häufig Methicillin-resistent (über 70%). Ursache der Resistenz ist auch hier das genetische Element SCCmec, das auf *S. aureus* übertragen werden kann.

Diese Ergebnisse haben erhebliche Bedeutung für das Verständnis der Epidemiologie von MRSA-Infektionen. So trifft die vielfach angenommene, weltweite Verbreitung einzelner, sogenannter 'pandemischer' MRSA-Klone nicht für alle epidemischen MRSA zu. Allerdings haben unsere weiteren Untersuchungen an anderen MRSA-Stämmen auch gezeigt, dass ihre interkontinentale Verschleppung gelegentlich vorkommen kann – vermutlich im Zuge von Patienten-Verlegungen oder durch Migration besiedelten Krankenhaus-Personals – und dass die importierten MRSA dann vor Ort wiederum Ausbrüche in Krankenhäusern und regionale Epidemien verursachen können.

Für die eingangs erwähnte molekulare Typisierung von *S. aureus* und MRSA-Isolaten zur Aufklärung von Infektketten und zur Bestätigung von Infektionsverläufen wird in fast allen europäischen Ländern die *spa*-Typisierung eingesetzt, die auf der Variabilität des *spa*-Gens beruht. Aus unserer Analyse genomweiter SNPs geht allerdings hervor, dass identische *spa*-Typen im Verlauf der Evolution offenbar mehrfach und unabhängig voneinander entstanden sind. Dies sollte insbesondere beim Vergleich von Isolaten unterschiedlicher geographischer Herkunft beachtet werden. Anhand einer Auswahl der von uns festgestellten SNPs ist eine zuverlässige Identifikation evolutionär unterschiedlicher Populationen möglich.

### Auf dem Weg zur Populationsgenomik

Die hier beschriebenen, neuen Einblicke in die Evolution und geographische Ausbreitung der MRSA wurden durch einen vergleichs-

**Arbeitsmaterial**

**Modul 4 Mikrobielle Systeme**

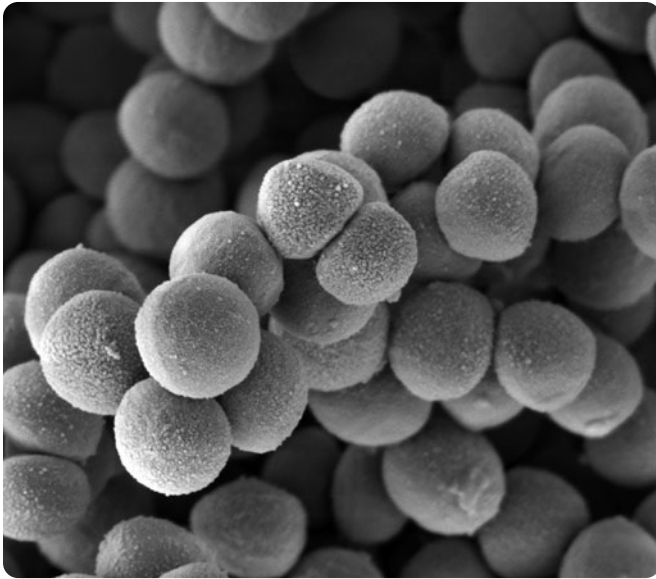


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus*. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gudrun Holland und Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut).

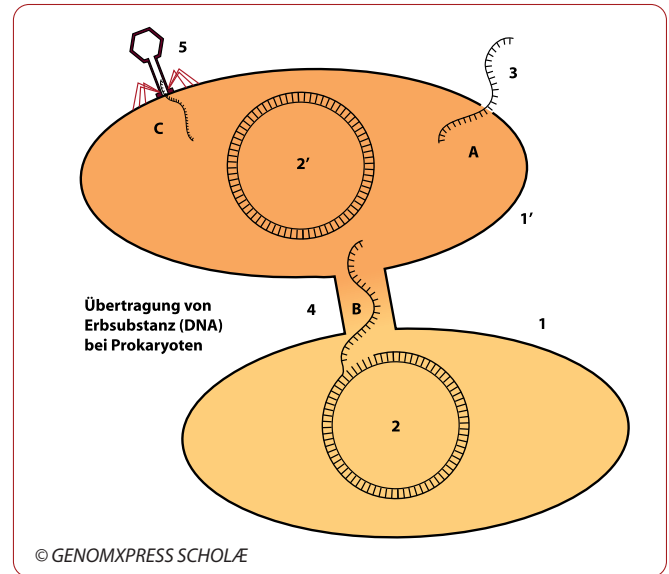


Abbildung zum Arbeitsauftrag 2: Möglichkeiten der Übertragung von genetischem Material bei Prokaryoten.

weise großen technischen und materiellen Aufwand ermöglicht. Es ist jedoch zu bedenken, dass hier dennoch nur etwa 1,6% jedes Staphylokokkengenoms analysiert werden konnten. Weit mehr Informationen wird man aus vollständigen Genomsequenzen aus einer vergleichbar großen Zahl von Staphylokokken-Isolaten gewinnen. In jüngster Zeit wurden neuartige Technologien zur DNA-Sequenzierung verfügbar (Roche-454, Illumina-Solexa), mit denen die Generierung von Sequenzdaten um ein Vielfaches schneller und gleichzeitig wesentlich kostengünstiger erfolgen kann als mit konventionellen Methoden. Mit einem einzigen Gerätelauflauf können heute mehrere Staphylokokken-Genome parallel und nahezu vollständig sequenziert werden. Damit ist es erstmals möglich, repräsentative Stichproben aus Bakterien-Populationen auf der Ebene von Gesamtgenomen zu betrachten. Gleichzeitig werden die bioinformatischen Analyse-Werkzeuge verbessert, die zur Bewältigung der rasant anwachsenden Datenmengen erforderlich sind. Für diese konsequente Weiterentwicklung der Populationsgenetik wurde der Begriff 'Populationsgenomik' geprägt.

Es ist absehbar, dass die Populationsgenomik unser Verständnis der Biologie der Krankheitserreger und ihrer Wechselwirkungen mit dem Wirt erheblich erweitern wird. Infektionen, lokale Ausbrüche und regionale Epidemien hinterlassen Spuren in den Genomen der Erreger, die es zu entschlüsseln gilt. Vollständige Genomsequenzen liefern dafür das bestmögliche Auflösungsvermögen. Insbesondere genomweite SNPs ermöglichen es, sowohl die Evolution wie auch demographische Entwicklungen in Bakterien-Populationen mit großer Präzision zu rekonstruieren. Die Integration epidemiologischer Modelle in populationsgenomische Analysen ist anzustreben, um die mathematische Modellierung der zeitlichen Dynamik von Ausbrüchen und Epidemien zu ermöglichen, was wiederum Vorhersagen über den Erfolg möglicher Gegenmaßnahmen erlauben wird.

**Originalpublikation**

Nübel, U et al. (2008) Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14130-14135. DOI: 10.1073/pnas.0804178105.

**Kontakt**

Dr. Ulrich Nübel  
 Robert Koch-Institut, Wernigerode  
 E-Mail: nuebelu@rki.de

**Arbeitsaufträge**

**Lesen sie den Artikel und bearbeiten Sie die folgenden Arbeitsaufträge:**

- 1. Begründen Sie, warum trotz seiner weiten Verbreitung Infektionen mit *Staphylococcus aureus* relativ selten sind, aber Infektionen mit bestimmten Stämmen von *S. aureus* eine hohe Letalität aufweisen.**
- 2. Wiederholen Sie in diesem Zusammenhang mögliche Wege des Genaustausches bei Bakterien (Konjugation, Transformation, Transduktion). Beschriften Sie die Strukturen 1 bis 4 in der obigen Abbildung und benennen Sie die Vorgänge A bis C!**
- 3. Diskutieren Sie den Einsatz von Antibiotika in der Tier- und Humanmedizin.**
- 4. Kennzeichnen Sie die besondere Bedeutung der hier vorgestellten Untersuchungen.**